



北海道公立大学法人  
**札幌医科大学**  
Sapporo Medical University

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title 論文題目	Pioglitazone suppresses excessive follicular development in murine preantral follicles (マウス前胞状卵胞に対するピオグリタゾンの卵胞過剰発育抑制作用の検討)
Author(s) 著者	長尾, 沙智子
Degree number 学位記番号	甲第 3073 号
Degree name 学位の種別	博士 (医学)
Issue Date 学位取得年月日	2020-03-31
Original Article 原著論文	Journal of Ovarian Research volume 12, Article number: 82 (2019)
Doc URL	
DOI	
Resource Version	Author Edition

## 学位論文の内容の要旨

報 告 番 号	甲第 3073 号	氏 名	長尾 沙智子
<p>論文題名</p> <p>Pioglitazone suppresses excessive follicular development in murine preantral follicles (マウス前胞状卵胞に対するピオグリタゾンの卵胞過剰発育抑制作用の検討)</p> <p>研究目的</p> <p>多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) は生殖可能年齢女性においてよく認められる内分泌疾患である。PCOS の特徴は、卵胞発育停止による無排卵、臨床的又は生化学的な高アンドロゲン状態そして多嚢胞性卵巣形態 (PCOM) であるが、なかでも高アンドロゲンは PCOS の主病因と考えられている。妊娠を望む PCOS 患者に対して排卵誘発剤を使用する際、しばしば卵巣過剰刺激症候群 (OHSS) を発症し治療の妨げとなることがあり、診断治療が適切に行われない重症例では不可逆性の重篤な障害や死に至る可能性がある。インスリン抵抗性改善薬は PCOS における排卵障害に有効であるほか、過剰卵胞発育を抑制することが報告されているが、その作用機序は明らかになっていない。</p> <p>一般に言われているインスリン抵抗性の卵巣への作用は、インスリンが LH 刺激を介してアンドロゲン分泌を促進、また性ホルモン結合グロブリン (SHBG) の低下により遊離型アンドロゲンを増加させることで初期胞状卵胞を増加させ、持続した高アンドロゲンにより卵胞発育停止に至ると考えられている。また胎児期の高アンドロゲンの曝露がインスリン抵抗性を惹起する可能性があり、インスリン抵抗性と高アンドロゲンは互いに関連している。インスリン抵抗性改善薬はインスリン抵抗性と高アンドロゲン両者の改善を介して PCOS へ作用する可能性があると考えられる。インスリン抵抗性を持つ PCOS に対するインスリン抵抗性改善薬による病態改善の報告は数多くあり、特にメトホルミンの投与に関してはすでに一般化している。今回我々は別の日本で使用可能なインスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジン誘導体のピオグリタゾンを使用した。チアゾリジン誘導体はインスリン分泌を刺激せずにインスリン受容体結合以降のインスリンシグナル伝達を刺激してインスリン抵抗性を改善する。アディポネクチンの分泌増加や、SHBG の増加で遊離型アンドロゲンを低下させることによる病態改善の可能性が考えられている。</p> <p>PCOS の研究のためこれまで多くの動物モデルにおいてアンドロゲン投与の影響が調べられてきたが、実験動物 (特にげっ歯類) にアンドロゲンを投与しても PCOS を完全に模倣</p>			

することはできていない。その理由の1つには、*in-vivo*の実験では高アンドロゲンによる卵巣への効果が、視床下部・下垂体の作用を経て修飾されることが考えられる。我々は以前の研究でマウスの前胞状卵胞において低濃度 FSH 環境下でのアンドロゲン投与により、FSHR 発現が増加し FSH 作用が増強することで卵胞発育促進作用を示すことを報告した。このことから低濃度 FSH 環境下で DHT を添加し卵胞発育が促進される状態を PCOS モデルとし、PCOS におけるインスリン抵抗性改善薬の影響を検討した。

## 研究方法

卵胞は卵母細胞と顆粒膜細胞、莢膜細胞から成り立っており、卵胞発育やステロイド産生は莢膜細胞と成長因子の相互関係によって調整され、さらにゴナドトロピンも卵胞発育に影響を与えている。視床下部および下垂体からの影響を排し、卵胞発育におけるアンドロゲンやインスリン抵抗性改善薬の影響を調べるためには、卵胞を単離して体外培養することが必要である。そこで本研究では、マウス 2 次卵胞を卵巣より単離し、96well plate に個別に培養することで視床下部および下垂体の影響を受けない状態とし、インスリン抵抗性改善薬が 2 次卵胞にどのような影響を与えるかを、生存率、卵胞径、ステロイド産生、成長因子の発現の変化を検討することで調査した。

6 週齢の ICR マウスより単離した直径約 100-160  $\mu$  m の二次卵胞を、96-well multiple cell-repellent surface plate を用いて、13 日間個別に培養した。アンドロゲン (Dihydrotestosterone; DHT) とピオグリタゾン (pioglitazone) の有無で 4 群に分けて培養を行い、1) コントロール群、2) DHT 500 ng/ml 群、3) pioglitazone 5 ng/ml 群、4) DHT 500 ng/ml + pioglitazone 5 ng/ml 群とした。

生存率および卵胞径は培養 day1, 6, 13 でそれぞれ評価し、day13 における培養液中のエストラジオール(E2)と血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を ELISA 法で測定した。成長因子は培養卵胞より抽出した mRNA の発現量を、定量的 PCR(qPCR)で測定した。測定した成長因子は、卵胞発育に関与することが報告されている、FSH レセプター(*Fshr*)、アンドロゲンレセプター(*Ar*)、phosphatase and tensin homolog (*Pten*)、また TGF- $\beta$  superfamily ligand として抗ミュー管ホルモン(*Amh*)、骨形成タンパク 2 (*Bmp2*)、*Bmp6*、TGF- $\beta$  superfamily receptor として AMH レセプター2 (*Amhr2*)、アクチビン A レセプター1 型 (*Acvr1*)、BMP レセプター1a 型 (*Bmpr1a*)、BMP レセプター1b 型(*Bmpr1b*)を選択した。

## 研究成績

生存率はいずれの群も 70-80%で有意差はなく、卵胞発育については day6 の卵胞径には有意差はなかったが、day13 の卵胞径で変化が見られた。コントロール群に比べてピオグリタゾン群が、DHT 群に比べて DHT+ピオグリタゾン群が有意に発育停滞した。培養液中エストラジオールはコントロール群と比較して DHT 群と DHT+ピオグリタゾン群で

有意に増加したが、ピオグリタゾン単独添加による有意な低下はみられなかった。培養液中 VEGF は高値を示した DHT 群と比べて DHT+ピオグリタゾン群で有意に低下していた。

RT-qPCR では、FSHR が DHT 群と DHT+ピオグリタゾン群がコントロール群に比べて増加しておりピオグリタゾン群はコントロール群に比べて低下していた。VEGF は培養液の結果と同様に DHT 群が増加したが、ピオグリタゾン添加によって有意に低下した。TGF- $\beta$  superfamily においては BMP2 がコントロール群と比べ DHT 群で増加し、ピオグリタゾンを添加すると有意に低下した。また AMH は DHT 群、ピオグリタゾン群ともにコントロール群より低下したが、AMHR は DHT 群が低下していたのに対しピオグリタゾン群では有意に増加していた。

## 考察

13 日間培養での卵胞生存率はいずれの群も 70-80%と差はなかったが、卵胞径は有意に差がみられた。DHT によって促進された卵胞発育は、ピオグリタゾン添加によって抑制された。我々は以前の実験で、マウス卵胞における FSH 依存性の獲得はおよそ 160-180 $\mu$ m の大きさであることを示したが、今回ピオグリタゾン添加によって多くの卵胞が 200 $\mu$ m 以下で発育停滞していたことから、FSH 依存期に入る前の段階で発育が停滞していると考えられた。

E2 に関しては以前の報告同様に DHT 投与では卵胞発育促進に伴って産生増加したが、ピオグリタゾン投与による卵胞発育抑制において E2 産生は低下する傾向はあるものの有意差を認めなかった。DHT 投与では FSHR の増加によって卵胞発育促進と E2 産生が増加していたが、ピオグリタゾンの卵胞発育抑制には FSHR 以外の作用機序が働いており、その機序で E2 産生は抑制されないためと考えられた。その機序を推測するために qPCR で卵胞発育に関与する因子の増減を確認することとした。

qPCR でピオグリタゾン添加による変化として有意な差があったのは BMP2 の低下であった。コントロール群と比較して DHT 添加群は有意に上昇したが、ピオグリタゾンを添加すると低下した。ピオグリタゾンなどのインスリン抵抗性改善薬によって TGF- $\beta$  superfamily の作用を抑制することは報告されており、今回の結果から TGF- $\beta$  superfamily の中で BMP2 の発現低下がピオグリタゾンの卵胞発育抑制作用に関与している可能性が考えられた。BMP2 は FSH 存在下で E2 増強作用を持つが、FSH 非存在下ではその作用は乏しいとされている。今回は低 FSH 環境であったために E2 低下が顕著ではなかった可能性が考えられた。

もうひとつの仮説として、AMH と AMHR の関与が考えられた。コントロール群と比べてピオグリタゾン添加群では AMH は低下したが、AMHR は有意に増加していた。卵胞発育における AMH の作用は明らかでない部分も多いが、マウスにおいては前胞状卵胞以降の卵胞発育を抑制すると言われている。ピオグリタゾン添加により AMHR

が増加することで、AMH 作用を補う形で前胞状卵胞の卵胞発育抑制効果が得られた可能性が考えられた。卵胞 1 個当たりの AMH 産生は低下していたが、臨床的には卵巣内に発育停滞した前胞状卵胞が多数存在しているため個体としての AMH 量は増加しており、卵胞に十分な AMH 作用を与えることができると考える。ただ、本実験では 2 次卵胞以降の発育を観察しているため、AMH の影響が反映される原始卵胞への影響は検討できなかった。

VEGF は排卵時や OHSS の際に上昇することが知られており、今回 DHT で産生増加したがピオグリタゾンを追加することで抑制された。ELISA でも qPCR でも同様の結果であった。ヒトにおいてインスリン抵抗性改善薬の投与で血清 VEGF 値が低下することが報告されており、臨床と矛盾しない結果であった。

## 結論

ピオグリタゾンは卵胞発育の抑制や VEGF を低下させ、OHSS の予防的効果を持つ可能性があると考えられた。また、卵胞発育抑制の機序として BMP2 関与が示唆された。インスリン抵抗性改善薬は PCOS 患者に対しての病態改善に加えて生殖補助医療における重篤な合併症のリスク低減に寄与する可能性がある。

## 論文審査の要旨及び担当者

(令和2年3月31日授与)

報告番号	甲第 3073 号	氏 名	長尾 沙智子
論文審査 担 当 者	主査 斎藤 豪 教授		副査 舩森 直哉 教授
	副査 小島 隆 教授		委員 小山内 誠 教授

論文題名	Pioglitazone suppresses excessive follicular development in murine preantral follicles (マウス前胞状卵胞に対するピオグリタゾンの卵胞過剰発育抑制作用の検討)
<p>結果の要旨</p> <p>ピオグリタゾンは卵胞発育の抑制や VEGF を低下させ、OHSS の予防的効果を持つ可能性があると考えられた。また、卵胞発育抑制の機序として BMP2 関与が示唆された。インスリン抵抗性改善薬は PCOS 患者に対しての病態改善に加えて生殖補助医療における重篤な合併症のリスク低減に寄与する可能性がある。</p> <p>以上より本研究は卵胞発育に関与する因子を解明する一助となり、体外培養の効率化、また PCOS の病態解明や不妊治療への応用など臨床への発展が期待されるものであり、審査委員全員より学位授与に値すると認められた。</p>	